

食道胃接合部内腔での活性酸化窒素種による傷害 :Ussing chamberモデルを用いた検討

著者	荒 誠之
号	77
学位授与番号	2530
URL	http://hdl.handle.net/10097/45739

氏 名（本籍）	あら 荒	のぶ 誠	ゆき 之
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 博 第 2 5 3 0 号		
学位授与年月日	平 成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻		
学 位 論 文 題 目	食道胃接合部内腔での活性酸化窒素種による粘膜 傷害：Ussing chamber モデルを用いた検討		

（主 査）

論文審査委員	教授 下瀬川	徹	教授 本郷道夫
	教授 佐々木	巖	

論文内容要旨

<研究背景>

食物中の硝酸塩は、腸管より吸収され唾液-腸管内循環によって唾液腺より分泌された後、口腔内細菌により亜硝酸塩に還元される。こうしてヒト口腔内に生成した亜硝酸塩は、嚥下された後、はじめて酸性条件となる食道胃接合部内腔で限局的に活性酸化窒素種 (RNOS; reactive nitrogen oxide species: 一酸化窒素 (NO) および NO 由来の活性な化学種) となり同部位に傷害を及ぼす可能性ある。

<研究目的>

食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現した *ex vivo* の Ussing chamber を用いたモデルによって、酸性条件下で、亜硝酸塩より発生させた RNOS により、ラット胃粘膜がどのような傷害を受けるかを検討し、ヒトにおける傷害に結びつける。

<研究方法>

食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現するため、ラットの胃粘膜のみを摘出し、管腔側と基底側で別々の溶液を還流させる Ussing chamber モデルを用いた。管腔側の溶液には、pH 2.5 の酸性条件下で生理的範囲内の濃度の亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) を加え RNOS を発生させて曝露した。粘膜のバリア機構の評価に関しては、電気生理学的な粘膜抵抗の測定、 ^3H で標識したマンニトールの管腔側から基底側への透過速度の測定、さらに粘膜表層上皮細胞間でバリア機構を形成する tight junction の傷害をみるため、tight junction 関連蛋白である occludin の免疫染色および Western blot を行った。実際に粘膜内に NO をはじめとした RNOS が拡散しているか確認するために、RNOS と組織中蛋白との反応生成物である DNIC (Dinitrosyl dithiolato iron complex) を低温下で EPR 法 (electron paramagnetic resonance spectroscopy) を用いて測定することで検討した。

<研究結果>

Ussing chamber にて管腔側に RNOS を曝露した結果、粘膜抵抗の低下および粘膜透過性の亢進、さらに免疫染色と Western blot で tight junction 関連蛋白である occludin の発現低下を認めた。また発生した RNOS の粘膜内への拡散を組織中 DNIC を低温 EPR 法で検出することにより確認した。

＜結 論＞

食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現したこの検討において、食道胃接合部内腔で発生した RNOS がその周囲粘膜の tight junction を傷害し、それによって粘膜防御機構を低下させることが示された。RNOS の化学修飾作用によるストレスが、ヒト食道胃接合部における重要な傷害因子となることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

＜研究背景＞食物中の硝酸塩は、腸管より吸収され唾液－腸管内循環によって唾液腺より分泌された後、口腔内細菌により亜硝酸塩に還元される。こうしてヒト口腔内に生成した亜硝酸塩は、嚥下された後、はじめて酸性条件となる食道胃接合部内腔で限局的に活性酸化窒素種（RNOS； reactive nitrogen oxide species：一酸化窒素（NO）および NO 由来の活性な化学種）となり同部位に傷害を及ぼす可能性がある。

＜研究目的＞食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現した *ex vivo* の Ussing chamber を用いたモデルによって、酸性条件下で、亜硝酸塩より発生させた RNOS により、ラット胃粘膜がどのような傷害を受けるかを検討し、ヒトにおける傷害に結びつける。

＜研究方法＞食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現するため、ラットの胃粘膜のみを摘出し、管腔側と基底側で別々の溶液を還流させる Ussing chamber モデルを用いた。管腔側の溶液には、pH 2.5 の酸性条件下で生理的範囲内の濃度の亜硝酸ナトリウム（ NaNO_2 ）を加え RNOS を発生させて曝露した。粘膜のバリア機構の評価に関しては、電気生理学的な粘膜抵抗の測定、 ^3H で標識したマンニトールの管腔側から基底側への透過速度の測定、さらに粘膜表層上皮細胞間でバリア機構を形成する tight junction の傷害をみるため、tight junction 関連蛋白である occludin の免疫染色および Western blot を行った。実際に粘膜内に NO をはじめとした RNOS が拡散しているか確認するために、RNOS と組織中蛋白との反応生成物である DNIC（Dinitrosyl dithiolato iron complex）を低温下で EPR 法（electron paramagnetic resonance spectroscopy）を用いて測定することで検討した。

＜研究結果＞Ussing chamber にて管腔側に RNOS を曝露した結果、粘膜抵抗の低下および粘膜透過性の亢進、さらに免疫染色と Western blot で tight junction 関連蛋白である occludin の発現低下を認めた。また発生した RNOS の粘膜内への拡散を組織中 DNIC を低温 EPR 法で検出することにより確認した。

＜結論＞食道胃接合部内腔およびその周囲粘膜の微小環境を再現したこの検討において、食道胃接合部内腔で発生した RNOS がその周囲粘膜の tight junction を傷害し、それによって粘膜防御機構を低下させることが示された。RNOS の化学修飾作用によるストレスが、ヒト食道胃接合部における重要な傷害因子となることが示唆された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。